

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN



Bureau voor de Industriële Eigendom

This is to declare that in the Netherlands on June 10, 1997 under No. 1006266.

in the name of:

**CHEMFERM V.O.F.**

in Breda

a patent application was filed for:

"Werkwijze voor de bereiding van ampicilline".

("Process for the preparation of ampicillin")

and that the documents attached hereto correspond with the originally filed documents.

Rijswijk, December 16, 1999.

In the name of the president of the Netherlands Industrial Property Office

A.W. van der Kruk.

## U I T T R E K S E L

De uitvinding betreft een werkwijze voor de bereiding van ampicilline waarbij 6-aminopenicilline  
5 zuur (6-APA) wordt onderworpen aan een enzymatische acyleringsreactie met behulp van een fenylglycinederivaat waarbij de totale concentratie van in het reactiemengsel aanwezige 6-APA plus ampicilline  
10 oplossing lager dan 300 mM wordt gehouden en de toegepaste molaire verhouding acyleringsmiddel tot 6-APA kleiner is dan 2,5.

De concentratie 6-APA in opgeloste vorm in het reactiemengsel aanwezig, kan op diverse manieren  
15 laag worden gehouden. Een mogelijkheid om de concentratie opgelost 6-APA laag te houden is slechts een deel van de totale hoeveelheid 6-APA voorleggen en de rest doseren tijdens de reactie. Bij voorkeur wordt de totale hoeveelheid 6-APA voorgelegd aan het begin  
20 van de reactie. Een geschikte methode om toch een lage concentratie opgelost 6-APA te bereiken is bijvoorbeeld door de pH op een lagere waarde te houden vergeleken met de pH-waarde waarbij een maximale oplosbaarheid van de reactanten wordt bereikt, door ervoor te zorgen dat  
25 de concentratie van het fenylglycinederivaat laag wordt gehouden, bijvoorbeeld door het fenylglycinederivaat gedeeltelijk in de loop van de reactie te doseren, bijvoorbeeld in de vorm van een zout ervan, bijvoorbeeld het zout van FGA en een mineraal zuur. Op deze wijze is  
30 het namelijk eenvoudig mogelijk om via het constant houden van de pH een optimale dosering van het FGA te bewerkstelligen. Bij voorkeur wordt FGA.1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> toegepast.

WERKWIJZE VOOR DE BEREIDING VAN AMPICILLINE

5 De uitvinding betreft een werkwijze voor de  
bereiding van ampicilline waarbij 6-aminopenicillino-  
zuur (6-APA) wordt onderworpen aan een enzymatische  
acyleringsreactie met behulp van een  
fenylglycinederivaat waarbij de totale concentratie van  
10 in het reactiemengsel aanwezige 6-APA plus ampicilline  
groter is dan 250 mM, de concentratie 6-APA in  
oplossing lager dan 300 mM wordt gehouden en de  
toegepaste molaire verhouding acyleringsmiddel tot  
6-APA kleiner is dan 2,5.

15 In WO-A 92/01061 wordt de bereiding van  $\beta$ -  
lactamderivaten, waaronder ampicilline beschreven via  
enzymatische acylering van een  $\beta$ -lactamkern,  
bijvoorbeeld 6-APA, bij hoge concentraties van  
acyleringsmiddel plus  $\beta$ -lactamderivaat. De concentratie  
20 van de  $\beta$ -lactamkern wordt relatief laag gehouden. Uit  
de voorbeelden valt af te leiden dat bij hoge molaire  
verhouding acyleringsmiddel tot  $\beta$ -lactamkern, hoge  
conversies worden gerealiseerd, terwijl bij lagere  
molaire verhouding acyleringsmiddel tot  $\beta$ -lactamkern de  
25 conversie beduidend lager is. Een nadeel van het  
toepassen van een hoge molaire verhouding  
acyleringsmiddel tot  $\beta$ -lactamkern is dat ten gevolge  
van optredende hydrolyse van het acyleringsmiddel,  
grote hoeveelheden acyleringsmiddel verloren gaan.

30 Bovendien is gebleken dat de opwerking van ampicilline  
bemoeilijkt wordt, doordat een relatief grote  
hoeveelheid D-fenylglycine ten opzichte van ampicilline  
aanwezig is in het na de enzymatische acyleringsreactie  
verkrege reactiemengsel, waardoor een kleinere  
35 hoeveelheid ampicilline kan worden geïsoleerd.

Gebleken is dat het, voor het behalen van een hoge conversie in het proces, van groot belang is de reactie bij hoge concentraties, dus ook bij hoge concentratie  $\beta$ -lactamkern, te kunnen uitvoeren.

5 In WO-A-96/02663 wordt een proces beschreven waarin de enzymatische acyleringsreactie van  $\beta$ -lactamkernen bij een constante concentratie van de reactanten wordt uitgevoerd. In het hier beschreven continu proces wordt een zo hoog mogelijk  
10 concentratieniveau van beide reactanten nagestreefd.

Gebleken is dat wanneer de bereiding van ampicilline wordt uitgevoerd bij hoge concentratie 6 APA, er toch slechts een relatief lage conversie werd bereikt, vergeleken met conversies die konden worden  
15 bereikt in de bereiding van andere  $\beta$ -lactamderivaten, zoals cefalexine.

Aanvraagster heeft nu verrassenderwijze gevonden dat door ervoor te zorgen dat de concentratie 6-APA in opgeloste vorm aanwezig in het reactiemengsel,  
20 relatief laag wordt gehouden, een hogere conversie kon worden bereikt, dan wanneer de concentratie opgelost 6-APA zo hoog mogelijk werd gekozen. Bovendien is gebleken dat de roerbaarheid van het reactiemengsel aanzienlijk beter was wanneer de concentratie opgelost  
25 6-APA laag werd gehouden.

Onder conversie wordt in het kader van deze uitvinding verstaan de molaire verhouding gevormd ampicilline tot ingezette hoeveelheid 6-APA. De concentratie opgelost 6-APA wordt uitgedrukt als de  
30 hoeveelheid 6-APA in molen per kg reactiemengsel; de totale concentratie, opgelost en niet opgelost, 6-APA en ampicilline wordt uitgedrukt als de hoeveelheid 6-APA plus ampicilline in molen per kg totaal reactiemengsel; het totale reactiemengsel kan naast de  
35 oplossing een aantal vaste stoffen bevatten, bijvoorbeeld 6-APA, ampicilline, fenylglycine en

geïmmobiliseerd enzym.

De molaire verhouding acyleringsmiddel tot 6-APA, d.w.z. de totale hoeveelheid toegevoegd fenylglycinederivaat gedeeld door de totale hoeveelheid toegevoegd 6-APA uitgedrukt in molen, is kleiner dan 2,5. Bij voorkeur ligt de molaire verhouding tussen 1,0 en 2,0, in het bijzonder tussen 1,2 en 1,8.

De enzymatische acyleringsreactie wordt bij voorkeur als batch proces uitgevoerd. Desgewenst is het ook mogelijk om de reactie continu uit te voeren, waarbij in line de concentratie opgelost 6-APA wordt geregeld.

De totale concentratie 6-APA plus ampicilline (in opgeloste en in onopgeloste vorm) in het reactiemengsel wordt in de werkwijze volgens de uitvinding hoger dan 250 mM, bij voorkeur hoger dan 300 mM, in het bijzonder hoger dan 350 mM gekozen.

De concentratie van opgelost 6-APA wordt gedurende de bereiding van ampicilline in essentie lager dan 300 mM, bij voorkeur lager dan 250 mM gehouden. Bij hogere concentratie van het acyleringsmiddel kan eventueel een hogere concentratie opgelost 6-APA, worden gekozen dan bij lagere concentratie. Bij een hogere concentratie van het acyleringsmiddel is de reactiesnelheid namelijk hoger, waardoor 6-APA slechts relatief kort in hoge concentratie in opgeloste vorm aanwezig is.

De concentratie 6-APA in opgeloste vorm in het reactiemengsel aanwezig, kan op diverse manieren laag worden gehouden. Een mogelijkheid om de concentratie opgelost 6-APA laag te houden is, slechts een deel van de totale hoeveelheid 6-APA voorleggen en de rest doseren tijdens de reactie. Een nadeel hiervan is echter dat 6-APA dan als vaste stof moet worden gedoseerd hetgeen praktische bezwaren oplevert. Bij voorkeur wordt dan ook de totale hoeveelheid 6-APA in

een batch proces voorgelegd aan het begin van de  
reactie, waarna gedurende de enzymatische  
acyleringsreactie de concentratie 6-APA in het  
reactiemengsel zal afnemen en de concentratie  
5 ampicilline zal toenemen. Een geschikte methode om toch  
een lage concentratie opgelost 6-APA te bereiken is  
bijvoorbeeld door de pH op een lagere waarde te houden  
vergeleken met de pH-waarde waarbij een maximale  
oplosbaarheid van de reactanten wordt bereikt. Een  
10 bijzonder geschikte methode om de 6-APA concentratie in  
opgeloste vorm laag te houden is bijvoorbeeld door  
ervoor te zorgen dat de concentratie van het  
fenylglycinederivaat laag wordt gehouden, bijvoorbeeld  
door het fenylglycinederivaat gedeeltelijk in de loop  
15 van de reactie te doseren.

Gebleken is namelijk dat wanneer de  
fenylglycinederivaat-concentratie laag wordt gehouden,  
er weinig 6-APA in oplossing gaat, zodat door dosering  
van het fenylglycinederivaat, de concentratie 6-APA in  
20 oplossing kan worden geregeld.

In de (enzymatische) acyleringsreactie kan  
als acyleringsmiddel fenylglycine in geactiveerde vorm  
bijvoorbeeld een amide of een ester, in het bijzonder  
een methylester worden toegepast. Bij voorkeur wordt D-  
25 fenylglycineamide (FGA) toegepast.

Een bijzonder geschikte uitvoeringsvorm wordt  
verkregen wanneer FGA wordt toegevoegd in de vorm van  
een zout ervan, bij voorkeur het zout van FGA en een  
mineraal zuur, bijvoorbeeld  $\text{FGA.HCl}$ ,  $\text{FGA.1/2H}_2\text{SO}_4$  en  
30  $\text{FGA.HNO}_3$ . Op deze wijze is het namelijk eenvoudig  
mogelijk om via het constant houden van de pH een  
optimale dosering van het FGA te bewerkstelligen. Bij  
voorkeur wordt  $\text{FGA.1/2H}_2\text{SO}_4$  toegepast omdat dit zout een  
zeer hoge oplosbaarheid heeft.

35 De temperatuur waarbij de enzymatische  
acyleringsreactie wordt uitgevoerd ligt meestal lager

dan 40°C, bij voorkeur tussen -5 en 35°C. De pH waarbij de enzymatische acyleringsreactie wordt uitgevoerd ligt meestal tussen 5,5 en 8,0, bij voorkeur tussen 6,0 en 6,8.

5 Als enzym kan in principe elk enzym worden toegepast dat geschikt is als katalysator in de koppelingsreactie. Dergelijke enzymen zijn bijvoorbeeld de enzymen die bekend zijn onder de algemene aanduiding penicilline amidase of penicilline acylase. Dergelijke  
10 enzymen zijn bijvoorbeeld beschreven in J.G. Shewale et. al. Process Biochemistry, Augustus 1989 p. 146-154 en in J.G. Shewale et. al. Process Biochemistry International, Juni 1990, p. 97-103. Voorbeelden van geschikte enzymen zijn enzymen afgeleid van  
15 Acetobacter, in het bijzonder Acetobacter pasteurianum, Aeromonas, Alcaligenes, in het bijzonder Alcaligenes faecalis, Aphanocladium, Bacillus sp., in het bijzonder Bacillus megaterium, Cephalosporium, Escherichia, in het bijzonder Escherichia coli, Flavobacterium,  
20 Fusarium, in het bijzonder Fusarium oxysporum en Fusarium Solani, Kluyvera, Mycoplana, Protaminobacter, Proteus, in het bijzonder Proteus rettgeri, Pseudomonas en Xanthomonas, in het bijzonder Xanthomonas citrii.

Bij voorkeur wordt een geïmmobiliseerd enzym  
25 toegepast, aangezien het enzym dan eenvoudig afgescheiden en hergebruikt kan worden. Een geschikte immobilisatietechnologie is bijvoorbeeld beschreven in EP A-222462. Een andere geschikte technologie wordt gevormd door het Penicilline G acylase te immobiliseren  
30 op een drager die een gelerend agens, bijvoorbeeld gelatine, en een polymeer met vrije aminogroepen, bijvoorbeeld alginaat amine, chitosan of polyethyleenimine bevat. Daarnaast kunnen enzymen ook als kristallijne stof worden ingezet (Clecs).

35 Van de geïmmobiliseerde enzymen zdie commercieel verkrijgbaar zijn, zijn bijvoorbeeld

bijzonder geschikt gebleken het Escherichia coli enzym van Boehringer Mannheim GmbH dat onder de naam Enzygel® commercieel verkrijgbaar is, het geïmmobiliseerde Penicilline-G acylase van Recordati en het  
5 geïmmobiliseerde Penicilline-G acylase van Pharma Biotechnology Hannover.

De (enzymatische) acyleringsreactie en de verdere opwerking van het reactiemengsel wordt in de praktijk meestal uitgevoerd in water. Desgewenst kan  
10 het reactiemengsel ook een organisch oplosmiddel of een mengsel van organische oplosmiddelen bevatten, bij voorkeur minder dan 30 vol.%. Voorbeelden van organische oplosmiddelen die kunnen worden toegepast zijn alcoholen met 1-7 C-atomen, bijvoorbeeld een  
15 monoalcohol, in het bijzonder methanol of ethanol; een diol, in het bijzonder ethyleenglycol of een triol, in het bijzonder glycerol.

Bij voorkeur wordt de reactie vrijwel volledig gestopt wanneer nagenoeg de maximale conversie  
20 is bereikt. Een geschikte uitvoeringsvorm om dit te bereiken is het verlagen van de pH, bij voorkeur tot een waarde tussen 4,0 en 6,3, in het bijzonder tussen 5,0 en 5,7. Een andere geschikte uitvoeringsvorm is het verlagen van de temperatuur van het reactiemengsel  
25 zodra de maximale conversie is bereikt. Ook een combinatie van beide uitvoeringsvormen is mogelijk.

Nadat de reactie vrijwel gestopt is bij het bereiken van maximale conversie, is het reactiemengsel meestal aanwezig in de vorm van een suspensie die  
30 meerdere vaste stoffen, bijvoorbeeld ampicilline, D-fenylglycine en geïmmobiliseerd enzym bevat. Het geïmmobiliseerde enzym wordt, vanwege de proceseconomie, bij voorkeur teruggewonnen. Dit kan bijvoorbeeld geschikt worden uitgevoerd door het  
35 reactiemengsel roerend te filteren over een zeef, waarbij bij voorkeur de draairichting van de roerder



zodanig wordt gekozen dat de suspensie in het centrum van de roerder omhooggepompt wordt. Vervolgens kunnen waardevolle componenten, bijvoorbeeld AMPI en FG, worden gewonnen; bijvoorbeeld met behulp van pH-shift.

- 5 De resterende moederloog bevat slechts weinig nevenproducten, en kan desgewenst vervolgens worden gerecirculeerd.

In het kader van deze uitvinding kunnen de verschillende componenten in de vrije vorm of als  
10 zouten in het reaktiemengsel aanwezig zijn. Met de genoemde pH-waarde wordt steeds de pH-waarde gemeten met een pH-elektrode geijkt bij kamertemperatuur bedoeld.

De uitvinding zal verder worden toegelicht  
15 aan de hand van de voorbeelden, zonder evenwel daartoe te worden beperkt.

Afkortingen:

- 20 AMPI.3H<sub>2</sub>O - ampicilline trihydraat  
6-APA            6 aminopenicillinezuur  
FGA            = D-fenylglycineamido  
FG            = D-fenylglycine

Assemblase™ is een geïmmobiliseerde Escherichia coli  
25 penicilline acylase uit E. coli ATCC 1105, zoals beschreven in WO-A-97/04086. De immobilisatie is uitgevoerd als beschreven in EP-A-222462, waarbij gelatine en chitosan als gellerend agens en glutaraaldehyde als crosslinker zijn gebruikt.

30 De uiteindelijke activiteit van de Escherichia coli penicilline acylase wordt bepaald door de hoeveelheid enzym die aan de geactiveerde bolletjes is toegevoegd en bedroeg 3 ASU/g drooggewicht waarbij 1 ASU (Amoxicilline Synthese Unit) is gedefinieerd als de  
35 hoeveelheid enzym die per uur 1 g Amoxicilline.3H<sub>2</sub>O genereert uit 6-APA en HPGM (bij 20°C; 6,5% 6-APA en

6,5% HPGM).

#### Voorbeeld I

Bereiding van FGA.1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oplossing.

- 5                    301,6 g FGA (2,00 mol) werd gesuspendeerd in  
650 g water bij T = 5°C. Onder roeren werd in 1 uur  
102,1 g 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,00 mol) toegedruppeld, waarbij de  
temperatuur d.m.v. koelen op T < 25°C werd gehouden.

#### 10 Voorbeeld II

Synthese van Ampicilline

Een enzymreactor (1,5 l, diameter 11 cm),  
voorzien van een zeefbodem met 175 µm gaas, werd gevuld  
met 300 g netto-nat Assemblase™.

- 15                    Een aanmaakreactor (1,2 l) werd gevuld met  
131,6 g 6-APA (0,600 mol), 30,2 g FGA (0,200 mol) en  
400 ml water (T = 10°C). Dit mengsel werd 15 minuten  
geroerd bij T = 10°C en vervolgens op t = 0 m.b.v. 100  
ml water (T = 10°C) in de enzymreactor overgebracht.

- 20                    Op t = 0 werd de roerder in de enzymreactor  
aangezet. Gedurende 283 minuten werd 423,7 g (0,800  
mol) FGA.1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oplossing met constante snelheid  
toegevoegd, waarbij de temperatuur op 10°C werd  
gehouden. De pH was ca. 6,3. Vanaf t = 328 minuten werd  
25 de pH op 6,3 gehouden d.m.v. titratie met 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Op t = 540 minuten was de hoeveelheid Ampicilline  
maximaal en werd de pH verlaagd naar 5,6 d.m.v.  
toevoegen van 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

De enzymreactor bevatte nu:

- 30                    575 mmol AMPT (=96% t.o.v. de ingozette  
hoeveelheid 6-APA)  
15 mmol 6-APA  
50 mmol FGA  
365 mmol FG

- 35 De concentraties tijdens de reactie zijn weergegeven in  
grafiek 1.

Vergelijkend Experiment A

## Synthese van Ampicilline

Een enzymreactor (1,5 l, diameter 11 cm), voorzien van een zeefbodem met 175  $\mu$ m gaas, werd gevuld met 300 g netto-nat Assemblase™.

Een aanmaakreactor (1,2 l) werd gevuld met 143,2 g (0,950 mol) FGA in 500 ml water bij 10°C. Bij 10°C werd onder koelen in 15 minuten 131,6 g 6-APA (0,600 mol) in kleine porties toegevoegd, terwijl de pH op 7,0 werd gehouden d.m.v. titratie met 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In totaal was er 54,5 ml 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> nodig. Het mengsel werd 15 minuten geroerd bij T = 10°C en vervolgens op t = 0 m.b.v. 100 ml water (T = 10°C) in de enzymreactor overgebracht. Op t = 0 werd de roerder in de enzymreactor aangezet. De pH werd op 7,0 gehouden d.m.v. titratie met 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De temperatuur werd op 10°C gehouden. Op t = 160 minuten was de hoeveelheid Ampicilline maximaal en werd de pH verlaagd naar 5,6 d.m.v. 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. In totaal was 147,6 ml 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> toegevoegd aan de enzymreactor. Het mengsel was relatief visceus en moeilijk roerbaar. De enzymreactor bevatte nu:

551 mmol AMPT (= 92% t.o.v. de ingezette  
hoeveelheid 6-APA)

24 mmol 6-APA

50 mmol FGA

330 mmol FG

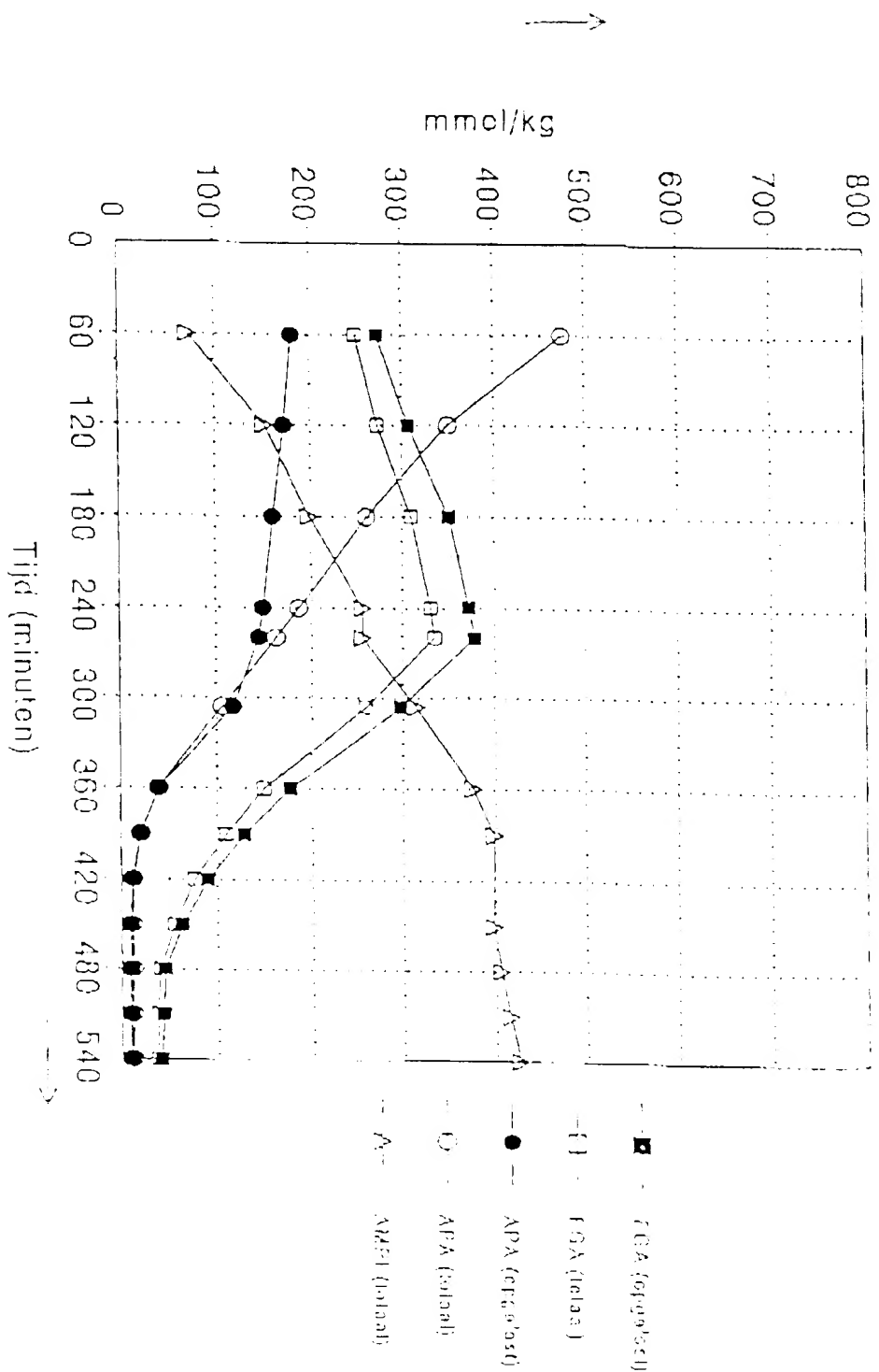
De concentraties tijdens de reactie zijn weergegeven in grafiek 2.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor de bereiding van ampicilline waarbij 6-aminopenicillinezuur (6-APA) wordt onderworpen aan een enzymatische acyleringsreactie met behulp van een fenylglycinederivaat waarbij de totale concentratie van in het reactiemengsel aanwezige 6-APA plus ampicilline groter is dan 250 mM, de concentratie 6-APA in oplossing lager dan 300 mM wordt gehouden en de toegepaste molaire verhouding acyleringsmiddel tot 6-APA kleiner is dan 2,5.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, waarin de concentratie van in het reactiemengsel aanwezige 6-APA plus ampicilline groter is dan 300 mM.
3. Werkwijze volgens conclusie 1 of 2, waarin de concentratie van 6-APA in oplossing lager wordt gehouden dan 250 mM.
4. Werkwijze volgens een der conclusies 1-3, waarin de molaire verhouding totaal toegepast acyleringsmiddel tot 6-APA kleiner is dan 2,0.
5. Werkwijze volgens een der conclusies 1-4, met het kenmerk, dat het 6-APA gedeeltelijk wordt gedoseerd in de loop van de enzymatische acyleringsreactie.
6. Werkwijze volgens een der conclusies 1-5, met het kenmerk, dat het fenylglycinederivaat gedeeltelijk in de loop van de enzymatische acyleringsreactie wordt gedoseerd.
7. Werkwijze volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat het fenylglycinederivaat wordt gedoseerd als een zout van D-fenylglycineamide en een zuur.
8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat het fenylglycinederivaat wordt gedoseerd in de vorm van een oplossing van D-fenylglycineamide.  $1/2\text{H}_2\text{SO}_4$  in water.

9. Werkwijze volgens een der conclusies 6-8, met het kenmerk, dat de dosering wordt geregeld middels pH-meting.
- 5 10. Werkwijze volgens een der conclusies 1-9, met het kenmerk, dat de pH van het reactiemengsel wordt verlaagd zodra nagenoeg de maximale conversie is bereikt.
- 10 11. Werkwijze volgens een der conclusies 1-10, met het kenmerk, dat de temperatuur van het reactiemengsel wordt verlaagd zodra nagenoeg de maximale conversie is bereikt.
12. Werkwijze voor de bereiding van ampicilline zoals beschreven en toegelicht aan de hand van de voorbeelden.

GRAFIK 1



GRAFIEK 2

